



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**TRABAJO FIN DE GRADO
PROPIEDADES ANTITUMORALES DE
TRIFOLIUM PRATENSE**

Autor: Juan José Serrano Luque
Tutor: Estefanía Hernández Benito
Convocatoria: Febrero 2017

RESUMEN

Actualmente el cáncer es una de las enfermedades con mayor incidencia en la población, presentando en numerosas ocasiones un mal pronóstico, siendo una de las principales causas de mortalidad. Debido a esto, muchas de las nuevas investigaciones que se llevan a cabo, están encaminadas al descubrimiento de nuevas terapias que reduzcan la mortalidad y aumenten la calidad de vida de las personas que lo padecen. Es, en la búsqueda de estas alternativas, donde empiezan a cobrar cada vez más importancia los estudios acerca de la acción de los componentes de diferentes plantas sobre el desarrollo de los tumores.

Trifolium pratense (trébol rojo), se utiliza principalmente para el tratamiento de los trastornos asociados a la menopausia gracias, especialmente, a las isoflavonas que presenta en su composición. Sin embargo, en los últimos años, han aumentado los estudios acerca de las propiedades antitumorales que estas isoflavonas pueden presentar. Dichos estudios, se basan principalmente en los tumores asociados a hormonas, centrándose en cáncer de mama y de próstata; pero también se han descubierto evidencias de su posible utilidad para el tratamiento del osteosarcoma y de su actividad sobre la angiogénesis implicada tanto en la generación, como en el mantenimiento de muchos tumores.

INTRODUCCIÓN

Trifolium pratense, más conocida como trébol rojo, pertenece a la familia de las leguminosas. Es una herbácea perenne de entre 10 y 60 cm de altura, pudiendo llegar a alcanzar los 110 cm de altura, y que presenta pilosidad variable sobre tallos erectos o ascendentes y un sistema radicular que consta de una raíz pivotante. Las hojas son trifoliadas, dispuestas alternamente, con foliolos ovalados, blandos, de grandes dimensiones (de 1 a 3 cm de longitud y de 8 a 15 mm de ancho), con dos estípulas basales estrechadas en arista, un peciolo de 1-4 cm de longitud y de color verde con un característico tono pálido creciente en la mitad más externa de la hojuela. Las flores, de 12 a 15 mm de longitud, poseen corolas formadas por 5 pétalos soldados de color rosa violáceo y con menor frecuencia blancas o purpúreas, siendo membranosas en la fructificación. El cáliz está formado por 5 sépalos soldados formando un tubo casi zigomorfo de apariencia campanulada, piloso, con 10 nervios, dientes lineares y una callosidad en la garganta. Las flores se presentan agrupadas en inflorescencias de unos 2 cm de diámetro con forma de cabezuelas globosas, sésiles y cubiertas en su base por las estípulas de las hojas superiores. El fruto es una legumbre sentada, incluida en el cáliz, indehiscente, de forma ovoide y contiene una semilla. Estas son de forma acorazonada, muy pequeñas y de tonalidades que varían del amarillo al violeta (figura 1). Las yemas de recambio se encuentran en la superficie del suelo o inmediatamente debajo durante la estación desfavorable, es decir, su biotipo es hemicriptófito.



Figura 1. Imagen obtenida de la revista online Botanical en la que se puede visualizar la estructura de *Trifolium Pratense*¹.

Las partes utilizadas de la planta son tanto las hojas como las flores, siendo en estas últimas donde encontramos en mayor concentración los principios activos que presentan

utilidad terapéutica: las isoflavonas. Las isoflavonas, también conocidas como fitoestrógenos, son una subclase de flavonoides con una estructura química similar a la del estradiol y con una actividad estrogénica débil². En *Trifolium Pratense* encontramos dos minoritarias, la formononetina y la Biochanina A; y dos mayoritarias, la genisteína y la daidzeína, ambos metabolitos de las dos minoritarias (figura 2).

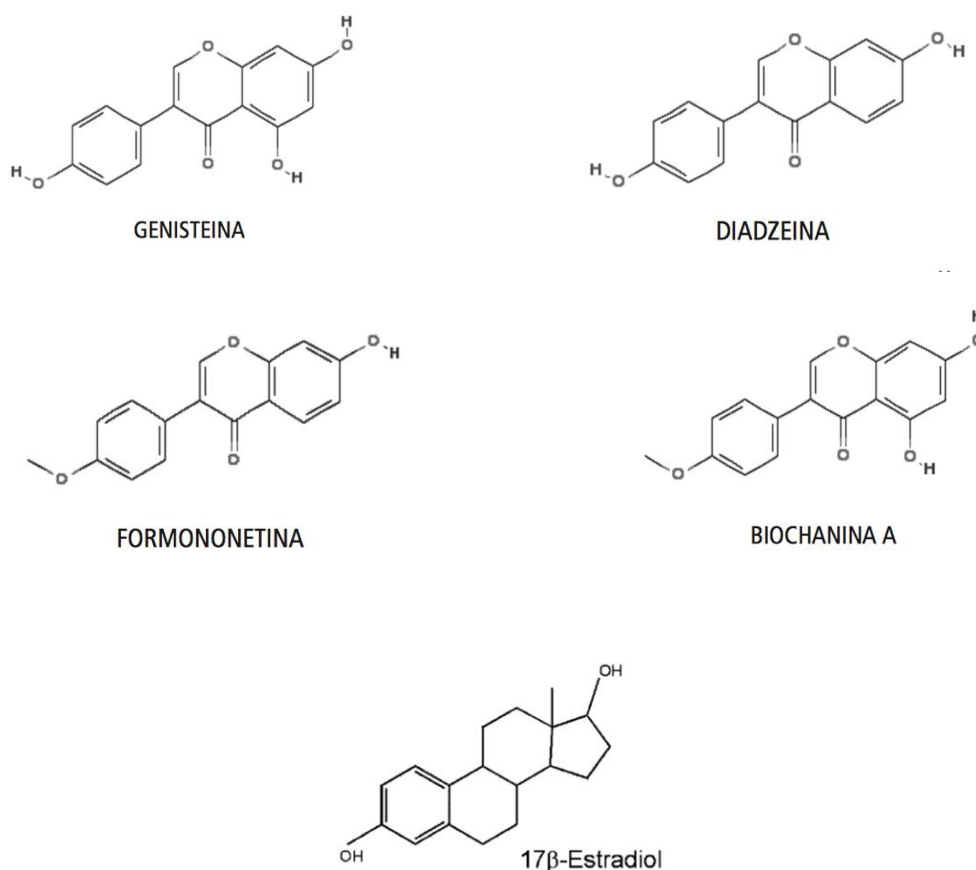


Figura 2. Estructura química de las cuatro isoflavonas principales de *Trifolium Pratense* y del estrógeno endógeno 17-β- Estradiol (L. Krenn et al., 2009)

Las isoflavonas pueden encontrarse conjugadas en forma de glucósidos, o libres, en forma de agliconas, siendo así más fácilmente absorbibles debido a su alta liposolubilidad y su menor peso molecular³. En el caso de *Trifolium Pratense* se encuentran en forma de glucósidos, requiriendo una hidrólisis previa llevada a cabo por β-glicosidasas de la mucosa intestinal para poder ser absorbidas, provocando este hecho una disminución en su velocidad de absorción.

En cuanto a su mecanismo de acción, las isoflavonas poseen la capacidad de unirse a los receptores estrogénicos, presentando mayor afinidad por los receptores estrogénicos tipo α que por los tipos β; a diferencia del estrógeno endógeno 17 β-estradiol que presenta

afinidades similares por ambos receptores. El complejo resultante de la unión de las isoflavonas con los receptores estrogénicos es funcionalmente equivalente al formado por el 17- β estradiol, ya que es capaz de inducir actividad transcripcional, aunque para que esto ocurra es necesario que la concentración de isoflavonas sea muy superior a la del estrógeno endógeno. También se encuentra documentada la posibilidad de que las isoflavonas tengan capacidad antiestrogénica, observándose que la capacidad agonista o antagonista de las isoflavonas depende de su propia concentración y de la cantidad de estrógenos endógenos, actuando como agonistas a bajas concentraciones y como antagonistas a concentraciones elevadas⁴; hecho que se explicará con mayor profundidad en el apartado de resultados.

En cuanto al resto de componentes químicos, en *Trifolium Pratense* encontramos:

- Ácidos: oxálico, glutámico, salicílico y cafeico. Estos dos últimos solo aparecen en las flores.
- Flavonoides.
- Aminoácidos: arginina, histidina, isoleucina, treonina, valina, leucina, lisina, metionina y serina.
- Vitaminas: niacina, tiamina, colina y vitamina C.
- Fibra.
- Minerales: calcio, potasio, fósforo, magnesio, selenio, cromo, cobalto, sodio y hierro¹.

En cuanto a sus propiedades terapéuticas, *Trifolium Pratense* destaca por su utilidad en la mejora de los síntomas menopáusicos y por la reducción en la incidencia de distintos procesos patológicos, como las enfermedades cardiovasculares y la diabetes; además de sus propiedades antitumorales⁵.

La menopausia se asocia a un incremento de la concentración en suero de la hormona estimulante de los folículos (FSH), a la aparición de fallo ovárico y a una reducción de los niveles de estradiol; lo que provoca, entre otros síntomas: sofocos, reducción de la densidad ósea y cambios de humor⁶. Hasta hace unos años estos síntomas eran tratados con estrógenos sintéticos, pero se descubrió que esta terapia de reemplazamiento hormonal aumentaba considerablemente el riesgo de padecer cáncer de mama u otros efectos secundarios como sangrado uterino⁷. Los extractos de *Trifolium Pratense* han sido

sometidos a multitud de estudios para dilucidar su utilidad en el tratamiento de estos síntomas característicos de la menopausia, aportando como resultados que estas preparaciones presentan múltiples efectos beneficiosos⁸, aunque el mecanismo de acción no está clarificado completamente, siendo aún desconocidos sus efectos a largo plazo.

En cuanto a la enfermedad cardiovascular, el Comité de Nutrición de la Asociación Americana del Corazón elaboró un informe en el que evalúa el papel de las isoflavonas sobre los principales factores de riesgo de las enfermedades cardiovasculares, entre los que se encuentran: colesterol-LDL, colesterol-HDL, triglicéridos, lipoproteína(a) y presión arterial. Dicho Comité concluyó que estos compuestos no reducen significativamente el colesterol-LDL ni modifican el colesterol-HDL, los triglicéridos o la presión arterial⁹. En cambio, sí que existen evidencias de la inhibición de la agregación plaquetaria y la trombogénesis por parte de las isoflavonas; debido a su actividad como inhibidoras de las tirosinquinazas, a la inhibición competitiva de la unión del tromboxano A-2 a su receptor plaquetario y al bloqueo que ejercen sobre los canales de calcio¹⁰, por lo que se demostró su utilidad en la prevención de patologías cardiovasculares.

Respecto a la diabetes, una de sus principales complicaciones es la glicosilación no enzimática de la hemoglobina, cuyo grado aporta información importante acerca de los efectos a largo plazo que tendrá la patología en el paciente¹¹. Al tratarse de una reacción oxidativa, los antioxidantes ejercen un importante papel preventivo; siendo las isoflavonas, especialmente la genisteína y la diadzeína, las encargadas de captar los radicales libres que provocan la oxidación; mejorando así la patología diabética¹².

OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo es realizar una revisión bibliográfica actualizada acerca de las propiedades antitumorales que presenta *Trifolium Pratense*, identificando la molécula activa frente a cada tipo de cáncer y explicando detalladamente su posible mecanismo o mecanismos de acción en dicha patología.

METODOLOGÍA

El presente trabajo se realizó mediante la búsqueda de artículos en las principales bases de datos de ámbito científico, tales como NCBI-Pubmed o MedLine; así como publicaciones en revistas científicas e informes llevados a cabo por el Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN), procediendo, una vez obtenida toda la información, a sintetizar y seleccionar los aspectos más relevantes.

RESULTADOS

La utilidad terapéutica de las distintas isoflavonas presentes en *Trifolium Pratense* frente a tumores de tipo hormonal ha sido evaluada por múltiples estudios, arrojando los siguientes resultados:

➤ CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama es el más común entre las mujeres, y la segunda causa de muerte mundial por esta enfermedad en dicho sexo¹³, por lo que su investigación es fundamental en la actualidad. Se trata de una enfermedad heterogénea, que se puede categorizar en dos subtipos: Receptor estrogénico positivo (RE+) y receptor estrogénico negativo (RE-). Ambos subtipos son considerados biológicamente como enfermedades distintas, y asociados con diferentes perfiles genéticos. Es por ello que los estrógenos juegan un papel muy importante en el desarrollo del cáncer de mama, ya que regulan un gran número de procesos patológicos en los tumores de tipo RE+, entre los que se encuentran la proliferación celular, la invasión de otros tejidos y los cambios en la arquitectura celular¹⁴. Los estrógenos presentan diferentes mecanismos inductores del cáncer de mama: por un lado, pueden ser metabolizados en diferentes catecoles gracias a dos enzimas del citocromo P-450, la estrógeno-2-hidroxilasa y la estrógeno-4-hidroxilasa, que hidroxilan los estrógenos en las posiciones 2 y 4 respectivamente. Estos metabolitos hidroxilados pueden ser convertidos en quinonas y semiquinonas, ambos compuestos carcinogénicos en animales. Por otra parte, los radicales libres generados por alguno de los metabolitos producidos en las hidroxilaciones anteriores pueden provocar daño oxidativo en el ADN¹⁵. Como ya se ha mencionado, los fitoestrógenos, a bajas concentraciones, actúan

como agonistas de los receptores estrogénicos estimulando la proliferación celular; mientras que a concentraciones elevadas, actúan como antagonistas de los receptores estrogénicos inhibiendo dicha proliferación e induciendo la apoptosis.

La principal isoflavona de *Trifolium pratense* que tiene actividad antitumoral en el cáncer de mama es la formononetina (figura 2), que lleva a cabo su acción sobre la línea celular MCF-7, una de las poblaciones celulares RE+ más características en dicho cáncer, a través de tres mecanismos principalmente:

-Inhibición de la proliferación celular e inducción de la apoptosis. El estudio de J. Chen en 2012 confirmó que la formononetina no era capaz de inhibir el crecimiento de células ER-, por lo que corroboró que ésta actuaba uniéndose al receptor estrogénico para inhibir la proliferación¹⁶. Tras la unión del estrógeno al receptor, se produce la activación de una de las principales vías de señalización citoplasmática, la MAPK (proteín-quinasa activada por mitógenos)¹⁷. La activación se produce por estrógenos o por agonistas estrogénicos, que se unen al receptor de tirosina-kinasa que se encuentra en la superficie celular. Esta unión provoca la activación del Ras, que a su vez provoca la activación de la proteín-kinasa Raf. El Raf activado es capaz de fosforilar la proteína p38, activándola y permitiendo que esta pueda inducir la apoptosis. Además, p38 puede inducir también la fosforilación de Bax, dando como resultado su translocación a la membrana mitocondrial. Bax es una proteína pro-apoptótica perteneciente a la familia Bcl-2. La activación de su componente intracelular provoca el aumento de permeabilidad de la membrana mitocondrial, iniciándose así la cascada apoptótica al liberarse de esta el citocromo C¹⁷. La formononetina además disminuye los niveles de Bcl-2, proteína que se encuentra en la membrana externa de la mitocondria y que impide la salida del citocromo c, por lo que actúa como una proteína anti-apoptótica¹⁶.

- Interrupción del ciclo celular, provocando la parada del mismo. El control del ciclo celular es un proceso altamente regulado que se divide en cuatro fases: G1, S, G2 y M. Estas fases siguen una transición secuencial en respuesta a factores de crecimiento o a la estimulación por oncogenes¹⁸. Las células en proliferación pasan por unos puntos de control entre las diferentes fases, siendo el que se produce entre G1 y S el más importante para la replicación del ADN y la mitosis. Es por esto que la modulación de la expresión de las proteínas que regulan el ciclo celular es una importante diana en el tratamiento terapéutico del cáncer. La ciclina D1 tiene un papel fundamental en el control del ciclo celular, provocando el desarrollo de tumores cuando se encuentra en elevadas cantidades¹⁹. La formononetina actúa disminuyendo la cantidad tanto de ciclina D1 como

de su ARN mensajero. Esta proteína se sintetiza durante la fase G1 del ciclo celular, previa activación de la ciclina dependiente de quinasa 2. Se comprobó mediante el análisis del contenido de ADN de células tratadas con diferentes concentraciones de formononetina como éstas se encontraban en su mayoría paradas en la fase G0/G1 del ciclo celular, aumentando la proporción de células afectadas a medida que aumenta la concentración de la isoflavona; pudiendo así verificar que la formononetina provoca la parada del ciclo celular por un mecanismo dosis-dependiente. Otra molécula que estimula la producción de ciclina D1 es el Akt, que se activa mediante una compleja vía de señalización intracelular que se inicia con la unión del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1, un potente mitógeno) a su receptor, que es de tipo tirosina quinasa, y que se encuentra situado en la membrana celular¹³. Al ser activado, el receptor fosforila diferentes proteínas y activa vías de señalización intracelulares que tienen un papel fundamental en la actividad celular. Una de estas vías es la PI3K/Akt, imprescindible en la regulación del ciclo celular, ya que el Akt actúa aumentando los niveles de ciclinas G1, así como la actividad de las ciclinas G1 dependientes de quinasas, cuyo objetivo es la activación de la ciclina D1. En este caso, la formononetina actúa inhibiendo la vía de señalización IGF1/IGF1R-PI3K/Akt, mediante la inactivación de IGF-1R y Akt, como se pudo comprobar con un análisis Western Blot, en el que ambas moléculas estaban disminuidas con respecto a muestras de la misma línea celular no tratados con formononetina¹⁷

- Inhibición de la migración e invasión de diferentes líneas celulares características de estos tumores. Es especialmente interesante frente al denominado cáncer de mama triple negativo, que es el que peor pronóstico presenta y que recibe este nombre debido a la ausencia del receptor estrogénico α , del receptor de progesterona y del receptor del factor de crecimiento epidérmico²⁰. Los pacientes con cáncer de mama triple negativo presentan un gran riesgo para el desarrollo de metástasis; siendo ésta un proceso escalonado, en el cuál, en primer lugar, se produce el desprendimiento de la célula tumoral del tumor primario, seguido de la migración, adhesión e invasión de dicha célula en la sangre o en los vasos linfáticos. Para que la célula cancerígena consiga atravesar la pared vascular del vaso en el que se encuentra es necesaria la colaboración de las metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMPs), las cuáles permiten a la célula llegar al tejido objetivo al llevar a cabo una degradación proteolítica de la matriz extracelular²¹. En el cáncer de mama se encuentran sobreexpresadas tanto la MMP-2 como la MMP-9, conocidas por ser enzimas clave en la degradación del colágeno tipo IV²². Fue Zhou R en 2014 el que

llevó a cabo un importante estudio sobre la acción de la formononetina frente a la metástasis, y para ello utilizó la línea celular MDA-MB-435, formada por células metastásicas triple negativas, y la línea 4T1 murina²³. Demostró en su estudio que la formononetina era capaz de inhibir las habilidades migratorias e invasivas de dichas células tumorales a concentraciones no citotóxicas (figura 3).

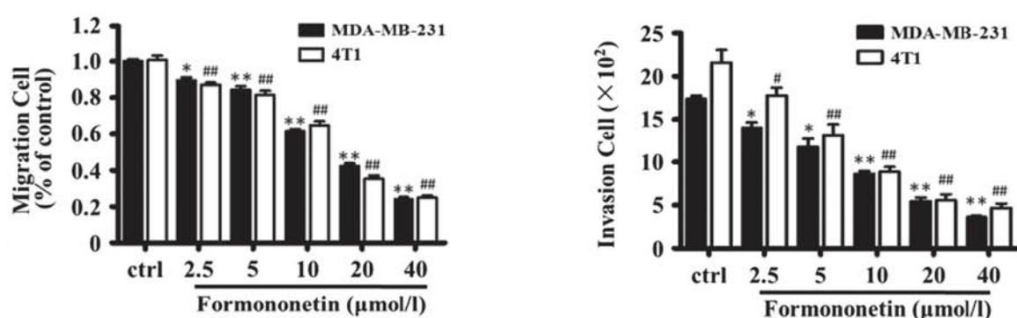


Figura 3. Concentración de células migratorias e invasivas en función de la concentración de formononetina. (Zhou, *et al.*, 2014)

Al no poder deberse el efecto a su citotoxicidad, el estudio se encaminó a dilucidar qué mecanismo llevaba a cabo la formononetina frente a estas líneas celulares. Se observó que los niveles de MMPs en las líneas celulares tratadas con la isoflavona estaban claramente disminuidos, mientras que los niveles de los reguladores específicos de estas metaloproteasas, los denominados TIMPs, estaban aumentados, especialmente TIMP-1 y TIMP-2 (figura 4); lo que se relaciona con la inhibición de la invasión de tejidos por parte de las células tumorales²⁴.

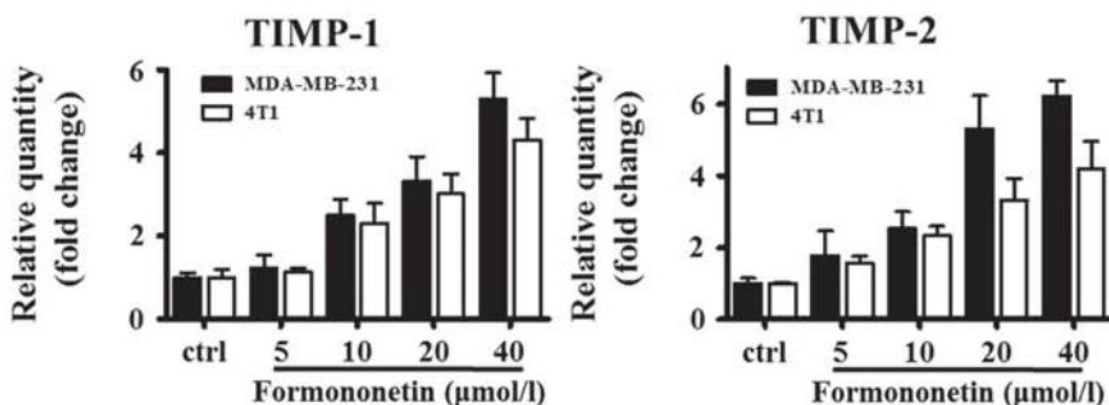


Figura 4: Aumento de la cantidad de TIMPs al aumentar la concentración de formononetina (Zhou, *et al.*, 2014)

Pero la formononetina no es la única isoflavona de *Trifolium pratense* que actúa frente al cáncer de mama. La biochanina A (figura 2) inhibe la aromatasa, enzima fundamental en

la síntesis de estrógenos a partir de colesterol. Los anillos A y C de la isoflavona compiten debido a su similitud estructural con los anillos C y D de los andrógenos por el sitio activo de la enzima²⁵ y, aunque el resto de isoflavonas presentan una estructura similar, la biochanina A es la única que alcanza un IC50 a concentraciones muy bajas (10-114 [M]). La genisteína, a pesar de tener una elevada similitud con la biochanina A por ser un metabolito de ésta, no presenta esta actividad inhibitoria, seguramente debido a la presencia de un grupo metil éter en la posición 4' que crea un impedimento estérico con la unión al sitio activo de la enzima¹⁵. Pero no actúa únicamente como un inhibidor competitivo de la enzima, la biochanina A actúa a nivel transcripcional reduciendo los niveles de ARN mensajero de la aromatasas; inhibiendo así la expresión génica de dicha enzima.

➤ CÁNCER DE PRÓSTATA

El cáncer de próstata consiste en una forma agresiva de adenocarcinoma, el cuál se caracteriza por provocar disfunción prostática y metástasis en otras partes del cuerpo, debido a que, desafortunadamente, estas células cancerígenas comienzan a proliferar sin control invadiendo tejidos adyacentes, dando como resultado el desarrollo de nuevos tumores²⁶.

En la próstata están expresados tanto los estrógenos como los receptores estrogénicos, y ambos juegan un papel fundamental en el desarrollo de la carcinogénesis²⁷. Los estrógenos ejercen su acción por una vía específica a través de receptores nucleares. El receptor estrogénico α no se expresa en las células epiteliales prostáticas²⁸, sino que la acción estrogénica es llevada a cabo únicamente por el receptor β , que es el encargado de regular el crecimiento y su inhibición²⁹. Como se explicó anteriormente, los fitoestrógenos únicamente actúan como agonistas de los receptores estrogénicos, estimulando la proliferación celular cuando se encuentran a bajas concentraciones, siendo antagonistas de estos receptores y útiles para el tratamiento antitumoral a elevadas concentraciones; por lo que únicamente actuarán sobre las células que expresen receptores estrogénicos³⁰. Las dos principales isoflavonas presentes en *Trifolium Pratense* que presentan actividad antitumoral a nivel prostático son la formononetina y la biochanina A, al igual que ocurre en el cáncer de mama.

La formononetina disminuye el número de células pertenecientes a las líneas PC-3 y LNCaP, dos de las líneas celulares más características de este tumor, aunque el efecto máximo se observa sobre esta última. Esta isoflavona causa la detención del ciclo celular en la fase G0/G1 mediante la inactivación de las vías IGF1/IGFR1- PI3K/Akt³¹, como ya se explicó en el apartado anterior sobre el cáncer de mama. Además, el estudio llevado a cabo por Y. Ye junto a su grupo de trabajo (Y. Ye, et al., 2012) midió la activación de la vía MAPK, una de las principales vías de proliferación celular como se señaló en el apartado anterior, en presencia de formononetina a diferentes concentraciones; y los resultados obtenidos confirmaron que esta molécula disminuye la activación de dicha vía, principalmente en la línea celular LNCaP³². Además, la formononetina, al igual que en el cáncer de mama, actúa sobre Bcl-2 y Bax. Como se explicó anteriormente, Bcl-2 es uno de los reguladores de la apoptosis más importante, presentando potentes propiedades antiapoptóticas; mientras que Bax consiste en una proteína pro-apoptótica que regula la muerte celular programada³³. Las células tumorales de la línea PC-3 presentan una elevada proporción de Bcl2 sobre Bax, lo que refleja que en estas células poseen las características fisiológicas para inhibir la apoptosis. En cambio, células tratadas con formononetina presentan esta proporción invertida, es decir, que la proporción de Bcl2 es inferior a la de Bax, generándose así un proceso pro-apoptótico. (figura 5)

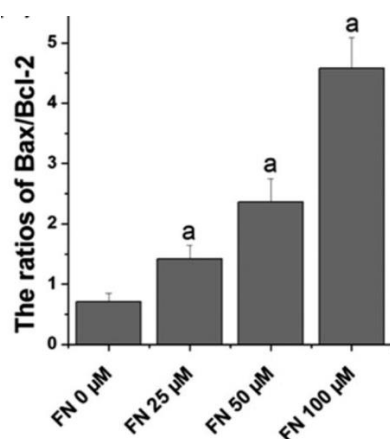


Figura 5: Aumento del ratio Bax/Bcl-2 al aumentar la concentración de formononetina. (Xing Zhang et al., 2015)

La biochanina A también presenta una elevada actividad frente a las células tumorales del cáncer de próstata. En este caso, su mecanismo de acción se encuentra directamente enlazado con el ligando inductor de la apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TRAIL). Este ligando desempeña un papel fundamental en la vigilancia

antitumoral llevada a cabo por el sistema inmune mediante las células T y las NK. Actúa induciendo la apoptosis de las células tumorales sin presentar toxicidad para las células que no se encuentran afectadas por el tumor³⁵. El ligando inductor de la apoptosis se une a los receptores de muerte que se encuentran presentes en las células tumorales (DR), iniciándose de esta forma la muerte celular programada de la célula, activándose esta mediante una cascada de señalización la caspasa 8. El problema radica en que existen un gran número de tumores que son resistentes al TRAIL, debido a factores como la ausencia de receptores de muerte en las células tumorales o la expresión de proteínas antiapoptóticas³⁶. La biochanina A sensibiliza a estas células tumorales resistentes frente a la acción de TRAIL, aumentando en gran medida el potencial apoptótico de este ligando. Este efecto se consigue gracias a que la Biochanina A aumenta la expresión de receptores de muerte en la superficie de las células tumorales, especialmente en las de la línea LNCaP. Además, el factor de transcripción nuclear NF- κ B, que actúa como un factor de supervivencia protegiendo a las células tumorales de la acción de TRAIL, es inhibido por la biochanina A provocando de este modo una disminución de la resistencia de las células tumorales frente al ligando inductor de la apoptosis³⁷.

Una dieta rica en isoflavonas de *Trifolium pratense* tiene más ventajas sobre el cáncer de próstata además de las ya mencionadas anteriormente producidas por el consumo de altas concentraciones de formononetina y de biochanina A. En primer lugar, provoca que los receptores estrogénicos ER se expresen como receptores funcionales en el núcleo y no como receptores citoplasmáticos, que es como se encuentran en ausencia de estas isoflavonas. Estos receptores son conocidos por inhibir la proliferación celular excesiva, proceso que es característico tanto de la hiperplasia benigna de próstata como del cáncer de próstata. La otra ventaja importante que presenta esta dieta rica en isoflavonas de *Trifolium pratense* es un gran aumento en la expresión de la proteína de adhesión E-caderina. Esta proteína dependiente de calcio juega un papel fundamental en el mantenimiento de la arquitectura tisular, ya que ancla las células a su matriz extracelular³⁸, reduciendo así en gran medida el riesgo de metástasis³⁹. Por último, también se produce una reducción de los niveles del factor de crecimiento transformante $\text{TGF}\beta 1$ ($\text{TGF}\beta 1$), que es un potente inhibidor de la proliferación celular, el cual se expresa principalmente como respuesta al crecimiento excesivo característico de la hiperplasia benigna de próstata y del cáncer de próstata⁴⁰. La reducción de este factor de crecimiento,

que únicamente se expresa en situaciones patológicas en el epitelio prostático, sugiere que las isoflavonas disminuyen la proliferación celular incontrolada en éste⁴¹.

➤ OSTEOSARCOMA

El osteosarcoma es la más común de las neoplasias malignas no hematológicas que afectan al hueso, siendo una de las principales causas de muerte por cáncer en la adolescencia⁴². Los osteoblastos expresan receptores estrógenicos, y tras numerosos estudios realizados, se ha llegado a la conclusión de que el osteosarcoma puede considerarse como un tumor ER positivo, jugando los estrógenos un importante papel en el desarrollo del mismo.

La formononetina actúa frente al desarrollo del osteosarcoma a través de dos mecanismos:

- Inhibiendo la proliferación de las células humanas del osteosarcoma (células U2OS).

En los diferentes estudios realizados se ha podido comprobar cómo tanto un aumento en la concentración de formononetina administrada como una mayor duración del tratamiento con esta isoflavona sin aumentar su concentración, provocan la inhibición de estas células tumorales. Esta inhibición tiene lugar al unirse la formononetina a los receptores estrógenicos de las células U2OS y provocar variaciones en las señales transduccionales y en el metabolismo celular, alterando así la proliferación de un modo similar a como actúan en el cáncer de mama y de próstata⁴³.

- Induciendo la apoptosis en las células U2OS (figura 6).

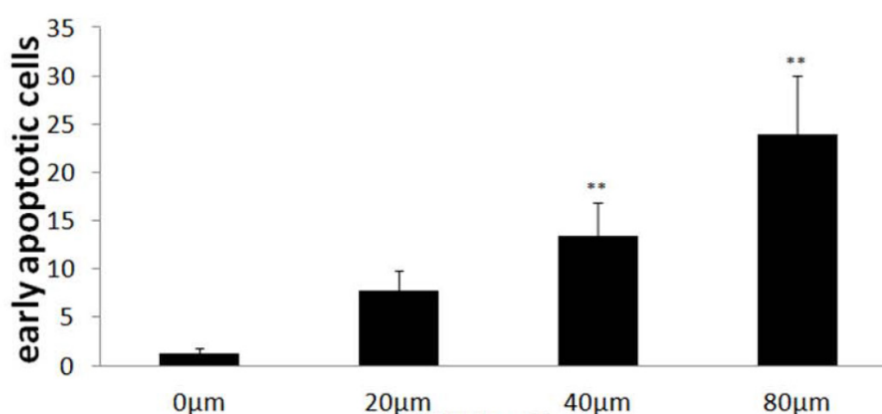


Figura 6. Incremento de células apoptóticas frente al incremento de formononetina. (Wei Hu, *et al.*, 2015)

En este proceso de apoptosis intervienen tres moléculas, cuya concentración varía al administrar diferentes concentraciones de formononetina. Por un lado, encontramos miR-375 (un tipo de micro RNA)⁴⁴ cuya expresión anómala está relacionada con la aparición

de diferentes tumores. Este micro RNA tiene la capacidad de mejorar la señalización del receptor estrogénico en las células, teniendo un papel importante en el desarrollo de tumores de tipo estrogénico como el osteosarcoma. El estudio llevado a cabo por Wei Hu (Wei Hu, et al., 2015), muestra como un aumento progresivo en la concentración de formononetina, disminuye la expresión de miR-375, posiblemente debido a que tanto este microRNA, como las células U2OS presentan vías de señalización comunes, inhibidas por esta isoflavona. Las otras dos moléculas que tienen un papel fundamental en la apoptosis de dichas células son, al igual que en los dos tumores anteriores, las proteínas Bcl-2 y Bax; estimulando un aumento de ésta última y una disminución de la primera⁴⁵.

➤ INHIBICIÓN DE LA ANGIOGÉNESIS

La angiogénesis es el proceso fisiológico que consiste en la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes. Aunque la angiogénesis es un fenómeno natural que se produce durante el desarrollo embrionario, el crecimiento del organismo y la cicatrización de las heridas; también es un proceso fundamental en la transformación maligna del crecimiento tumoral. Durante el desarrollo del tumor los factores de crecimiento, como el bFGF y VEGF, pueden inducir el crecimiento capilar en el tumor proveyendo a este de los nutrientes que necesita para crecer. Por lo tanto, la angiogénesis es un paso necesario y requerido para la transición de un pequeño grupo inofensivo de células a un tumor de gran tamaño; pero también es imprescindible para la diseminación de un tumor y por tanto, para la producción de metástasis. Además, la angiogénesis no tiene importancia únicamente en el desarrollo de tumores, ya que en los últimos años se ha comprobado que su exceso está relacionado con numerosas patologías que son típicas en mujeres tras la menopausia; como aterosclerosis, artritis, osteomielitis, retinopatía diabética, etc.

En este caso, son las isoflavonas daidzeína y genisteína las encargadas de llevar a cabo la acción antitumoral. El principal estudio acerca de la inhibición de la angiogénesis por un extracto de *Trifolium pratense* se llevó a cabo por L. Krenn y D.H Papper en 2009. Dicho estudio se llevó a cabo mediante un ensayo en membrana corioalantoidea (CAM), muy utilizada para analizar eventos angiogénicos, que consistió en un test *in vivo*, sensible y barato, utilizado para investigar el potencial antiangiogénico de distintos compuestos.

No sólo describió la eficacia de los compuestos, sino que también proporcionó información acerca de la toxicidad de los mismos. Este estudio confirmó el efecto antiangiogénico de la genisteína y daidzeína (figura 7), y además describió cómo un mayor grado de metilación en cada una de los compuestos, suponía una masiva pérdida de actividad antiangiogénica. Dichas isoflavonas disminuyen los niveles de RNA mensajero (mRNA) de las proteínas relacionadas con la angiogénesis⁴⁶, tales como IL-8, metaloproteasa de la matriz 13 o fibronectina; y estimulan la producción de inhibidores endógenos de la angiogénesis tales como la endostatina, la angiostatina y la trombospondina – 1.

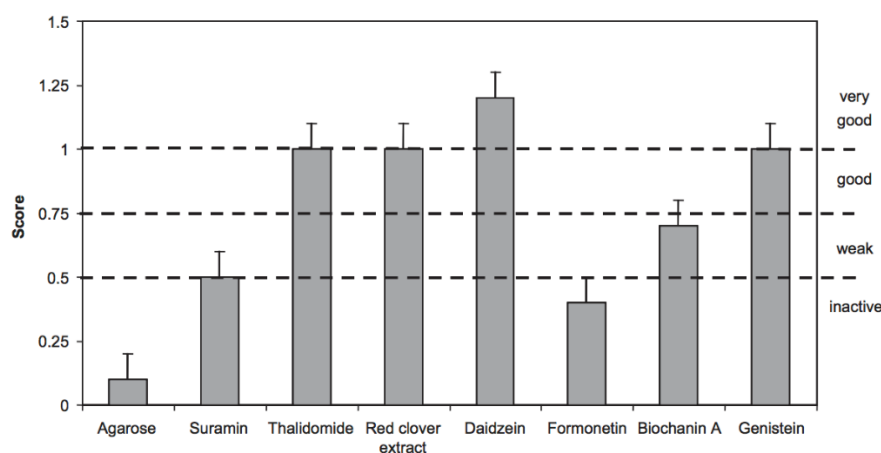


Figura 7. Efecto antiangiogénico provocado por diferentes compuestos, cabe destacar la actividad antiangiogénica de Daidzeína y Genisteína (L. Krenn, *et al.*, 2009)

DISCUSIÓN

Las isoflavonas, gracias a su estructura química, constituyen una importante baza en el tratamiento de los tumores asociados a hormonas. *Trifolium Pratense* presenta en su composición algunas de las más activas frente a estos tumores, como la formononetina y la biochanina A; por lo que en los últimos años se han realizado un gran número de estudios acerca de las propiedades antitumorales de estos compuestos.

En el caso del cáncer de mama RE positivo, los resultados obtenidos son prometedores en cuanto a la reducción de la migración, la proliferación y la invasión de las células tumorales; si bien es muy importante recalcar que son necesarios estudios a largo plazo, además de antojarse como imprescindible el conocimiento por parte de los profesionales

de la salud de los efectos, tanto estrogénicos como antiestrogénicos, que las isoflavonas pueden presentar en función de las concentraciones utilizadas. También es muy importante destacar la utilidad que presenta la formononetina frente al cáncer de mama triple negativo, que es el que peor pronóstico presenta en la actualidad, gracias a su acción sobre las metaloproteinasas, consiguiendo reducir en gran medida la diseminación del tumor a otros tejidos.

En cuanto al cáncer de próstata los estudios realizados han aportado evidencias científicas de que las isoflavonas de *Trifolium pratense*, especialmente la formononetina, pueden presentar un papel fundamental en las alternativas terapéuticas a corto plazo frente a dicho tumor. Además, una dieta rica en *Trifolium Pratense* aumenta el número de receptores estrogénicos ER expresados como funcionales en el núcleo celular y la cantidad de proteína de adhesión E-caderina, que juega un papel fundamental en el mantenimiento de la arquitectura tisular.

Respecto al osteosarcoma y a la inhibición de la angiogénesis, el número de estudios realizados es mucho menor que en los dos casos anteriores, si bien existen evidencias científicas acerca de su utilidad tanto para el tratamiento del tumor como para la disminución del proceso angiogénico, proceso que es fundamental en el desarrollo y crecimiento de los tumores; siendo por tanto útil como tratamiento coadyuvante.

Como se puede apreciar, se han realizado un gran número de estudios para evaluar la eficacia terapéutica de los extractos de *Trifolium Pratense*, pero también es necesario conocer cuál es la toxicidad, si la hubiera, que presenta la planta en su consumo a largo plazo en el tratamiento preventivo de las diferentes patologías. Uno de los estudios más destacados se realizó a partir de varios grupos de mujeres (mujeres pre-menopáusicas y menopáusicas) y se analizó durante 3 años el consumo de un suplemento dietético comercializado de trébol rojo. Pasado el tiempo de estudio, se observó cómo no existían cambios significativos en la densidad mamaria en las mujeres post-menopáusicas en comparación con el grupo control; mientras que existió un pequeño aumento de la densidad en las mujeres pre-menopáusicas sin efectos relevantes a corto plazo. Tampoco aparecieron efectos significativos respecto al colesterol basal, que no experimentaba cambios entre el grupo tratado con el suplemento y el control; por lo que el consumo continuado de isoflavonas de *Trifolium Pratense* tampoco afectó a la estabilidad cardiovascular⁴⁷.

CONCLUSIÓN

Trifolium pratense es conocido por ser eficaz para el tratamiento de los trastornos asociados a la menopausia, pero en esta revisión se ha demostrado como sus isoflavonas son además una fuente útil para el tratamiento de determinados tipos de cáncer, y por tanto, un punto importante de partida en la búsqueda de alternativas terapéuticas frente a estos tumores. Aún así, queda aún un largo camino por recorrer en cuanto al tratamiento de los tumores asociados a hormonas con las isoflavonas presentes en *Trifolium Pratense*. Si bien es evidente que existe eficacia frente a las líneas celulares estudiadas, describiéndose en muchos casos su posible mecanismo de acción, se desconocen tanto sus efectos a largo plazo como los que puede presentar en función de la carga estrogénica endógena del individuo. Esto se debe a la capacidad que presentan las isoflavonas para actuar como agonistas o antagonistas en función de dicha carga.

En cuanto a sus propiedades antiangiogénicas, éstas le confieren una gran utilidad como coadyuvante en el tratamiento de diferentes tipos de tumores, no solo los asociados a hormonas; aunque son necesarios también estudios acerca de las posibles interacciones que pueda presentar la planta con los antineoplásicos más comunes en la actualidad, área que aún está muy poco investigada.

Refiriéndonos a la seguridad a corto plazo, se puede concluir que las isoflavonas de *Trifolium Pratense* en las concentraciones estudiadas son seguras, bien toleradas y no muestran un efecto estrogénico significativo sobre la densidad mamaria; además de no afectar ni al esqueleto ni al correcto funcionamiento cardiovascular.

Por lo tanto, nos encontramos ante una fuente de compuestos antitumorales muy a tener en cuenta en un futuro próximo y que pueden suponer una gran baza en la mejora del tratamiento de tumores que en la actualidad no tienen un pronóstico tan positivo como cabría esperar.

BIBLIOGRAFÍA

1. Revista Botanical, disponible en: <http://www.botanical-online.com/medicinalstrebol.htm>
2. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación con las consecuencias asociadas al consumo de isoflavonas. Revista del comité científico número 5: 77-93
3. Kano M., Takayanagi T., Harada K., Sawada S., Ishikawa F. Bioavailability of isoflavones after ingestion of soy beverages in healthy adults. *Journal Nutrition* vol 136 (9), (2009) pp: 2291-2296.
4. Hwang C.S., Kwak H.S., Lim H.J., Lee S.H., Kang Y.S., Choe T.B., Hur H.G., Han K.O. Isoflavone metabolites and their in vitro dual functions: they can act as an estrogenic agonist or antagonist depending on the estrogen concentration. *Journal Steroid Biochemistry & Molecular Biology* Vol 101 (4-5), (2006) pp: 246-253.
5. Jeri A. R. The use of an isoflavone supplement to relieve hot flushes. *Female patient* 2002; 27:35-7.
6. Rymer J., Wilson R., Ballard K. Making decisions about hormone replacement therapy. *British Medical Journal* 326 (2003) 322-326
7. Fernández E., Gallus S., Bosetti C., Franceschi S., Negri E., La Vecchia C. Hormone replacement therapy and cancer risk: a systematic analysis from a network of case-control studies. *International Journal Cancer* 105 (2003) 408-412
8. Beck V., Rohr U., Jungbauer A. Phytoestrogens derived from red clover: An alternative to estrogen replacement therapy? *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 94 (2005) 499-518
9. Sacks F.M., Lichtenstein A., Van Horn L., Harris W., Kris-Etherton P., Winston M. Soy protein, isoflavones, and cardiovascular health: a summary of a statement for professionals from the American heart association nutrition committee. *Circulation*, vol 113 (2006), pp: 1034-1044.
10. Montalbán E. Isoflavonas y riesgo cardiovascular en la menopausia. *Ginecol. Obstet. Clín.* Vol 6 (4) (2005), pp: 221-229.
11. Haddadinezhad S., Ghazaleh N. Relation of fasting and postprandial and plasma glucose with hemoglobinA1c in diabetics. *Int. J. Diabetes Dev Ctries* 30 (1) (2010) pp: 8-10.
12. Mohsen Hosseini, Sedigheh Asgary, Somayeh Najafi. Inhibitory potential of pure isoflavonoides, red clover, and alfalfa extracts on hemoglobin glycosylation. *ARYA Atheroscler* 2015; volume 11, Issue 2 (133-138).
13. Hilakiyi-Clarke L., Wang C., Kalil M., Riggins R., Pestell R.G. Nutritional modulation of the cell cycle and breast cancer. *Endocrine Relat Cancer* (2004); 11:603-622.
14. Kim KH., Moriarty K., Bender JR. Vascular cell signaling by membrane estrogen receptors. *Steroids* 2008; 73: 864-869.
15. Yun Wang, Wai Man Gho, Franky L. Chan, Shiuan Chen and Lai K. Leung. The red clover isoflavone biochanin A inhibits aromatase activity and expression. *British Journal of Nutrition* (2008), 99, 303-310.
16. Jin S., Zhan QY, Kang XM, Wang JX, Zhao WH. Daidzein induces MCF-7 breast cancer cell apoptosis via the mitochondrial pathway. *Ann Oncol* (2010); 21:263-268.
17. Chen J., Sun L. Formononetin – induced apoptosis by activation of Ras/p38 mitogen – activated protein kinase in estrogen receptor – positive human breast cancer cells. *Horm Metab Res* 2012; 44: 943-948.
18. Park S.J., Park S.H., Kim J.O., Kim J.H., Park S.J. Downregulation of KLF4 and the Bcl-2/Bax ratio in advanced epithelial ovarian cancer. (2012) *Oncol Lett* 4, 1033-1036.
19. Chen J., Zeng J., Xin M., Huang W., Chen X. Formononetin induces cell cycle arrest of human breast cancer cells via IGF1/PI3K/Akt pathways in vitro and in vivo. *Horm Metab Res* 2011, 43: 681-686.
20. Roy PG., Thompson AM. Cyclin D1 and breast cancer. *Breast* 2006; 15:718-727.

21. Chen LH., Fang J., Sun Z., Li H., Wu Y., Demark-Wahnefried W., Lin X. Enterolactone inhibits insulin-like growth factor-1 receptor signaling in human prostatic carcinoma PC-3 cells. *J. Nutrition* 2009; 139:653-659.
22. Mahamodhossen YA., Liu W., Rong-Rong Z. Triple – negative breast cancer: new perspectives for novel therapies. *Med Oncol* (2013), 30:653.
23. Deryugina EI., Quigley JP. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metas Rev* (2006); 25:9-34.
24. Pellikainen JM., Rapponen KM., Kataja VV., Kellokoski JK., Eskelinen MJ., Kosma VM. Expression of matrix metalloproteinase MMP-2 and MMP-9 in breast cancer with a special reference to activator protein-2, HER2, and prognosis. *Clinical cancer research* 2004; 10:7621-7628.
25. Alix-Panabieres C., Muller V., Pantel K. Current status in human breast cancer micrometastasis *Curr Opin Oncol* 2007; 10: 558-563.
26. Baade PD., Youlten DR., Kmjacki LJ. International epidemiology of prostate cancer: geographical distribution and secular trends: *Mol Nutr Food Research* 53, 171-184, 2009
27. Hara T., Miyazaki H., Lee A., Tran CP., Reiter RE. Androgen receptor and invasion in prostate cancer. *Cancer research* (2008); 68: 1128-1135.
28. Pelletier G., Labrie C., Labrie F. Localization of estrogen receptor alpha, estrogen receptor beta and androgen receptors in the rat reproductive organs. *J. Endocrinol* (2000); 165: 359-370.
29. Lau KM., LaSpina M., Long J., Ho SM. Expression of estrogen receptor (ER)-alpha and ER-beta in normal and malignant prostatic epithelial cells: regulation by methylation and involvement in growth regulation. *Cancer research* (2000), 60:3175-3182.
30. Suzuki H., Ueda T., Ichikawa T., Ito H. Androgen receptor involvement in the progression of prostate cancer. *Endocr relat cancer* (2003); 10:209-216.
31. Fang J., Zhou Q., Shi XL., Jiang BH. Luteolin inhibits insulin-like growth factor 1 receptor signaling in prostate cancer cells. *Carcinogenesis* (2007); 28: 713-723.
32. Ye. Y., Hou R., Chen J., Mo L., Zhang J., Huang Y., Mo Z. Formononetin – induced apoptosis of human prostate cancer cells through ERK1/2 mitogen-activated protein kinase inactivation. *Horm Metab Research* (2012); 44:263-267.
33. Fan Y., Chen H., Qiao B., Luo L., Ma H., Li H., Jian J., Niu D., Yin Z. Opposing effects of ERK and p38 MAP kinases on HeLa cell apoptosis induced by dipyrithione. *Mol Cells* (2007); 23: 30-38.
34. Xing Zhang, Lingyun Bi, Yu Ye, Jian Chen. Formononetin induces apoptosis in PC-3 prostate cancer cells through enhancing the Bax/Bcl-2 ratios and regulating the p38/Akt Pathway. *Nutrition and cancer*, 66:4 (2015), 656-661.
35. Borner C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life or death decisions. *Mol Immunol* (2003); 39: 615-647.
36. Thorburn A., Behbakth K., Ford H. TRAIL receptor – targeted therapeutics. Resistance mechanisms and strategies to avoid them. *Drug resist update* (2008); 11: 17-24.
37. Raffoul JJ., Wang Y., Kucuk O. Genistein inhibits radiation-induced activation of NF-KappaBeta in prostate cancer with cells promoting apoptosis and G2/M cell cycle arrest. *BMC cancer* (2006); 6:107.
38. Slater M. Dynamic interactions of the extracellular matrix. *Histol. Histopathol* (1996); 11: 175-180.
39. Bussemakers MJ., Van Bokhoven A., Tomita K., Jansen CF., Schalken JA. Complex cadherin expression in human prostate cancer cells. *International Journal Cancer* (2000); 85: 446-450.
40. Cardillo MR., Petrangeli E., Perracchio L., Salvatori L., Ravenna L., Di Silverio F. Transforming growth factor- beta expression in prostate neoplasia. *Analyt Quan Cytol Histol* (2000); 22: 1 – 10.
41. Slater M., Brown D. In the prostatic epithelium, dietary isoflavones from red clover significantly increase estrogen receptor beta and E- cadherin expression but decrease transforming growth factor β 1. *Prostate cancer and prostatic diseases* (2000); 5: 16-21.

42. Lamoreux F., Trichet V., Chipoy C., Blanchard F., Gouin F., Redini F. Recent advances in the management of osteosarcoma and forthcoming therapeutic strategies. *Expert Rev Anticancer Therapy* (2007); 7: 169-181.
43. Liu Y., He J., Chen X., Li J., Shen M., Yu W., Yang Y., Xiao Z. The proapoptotic effect of formononetin in human osteosarcoma cells: involvement of inactivation of ERK and Akt pathways. *Cell Physiol Biochem* 2014; 34:637-645.
44. Liu AM., Poon RT., Luk JM. MicroRNA-375 targets hippo-signaling effector YAP in liver cancer and inhibits tumor properties. *Biochemistry Biophys Res Commun* (2010); 394: 623-627.
45. Wei Hu., ZengMing Xiao. Formononetin induces apoptosis of human osteosarcoma cell line U2OS by regulating the expression of Bcl-2, Bax and MiR-375 in vitro and in vivo. *Cell Physiol Biochemistry* (2015); 37: 933-939.
46. Krenn L. and Paper D.H. Inhibition of angiogenesis and inflammation by an extract of red clover. *Phytomedicine* 16 (2009): 1083-1088.
47. Trevor J Powles, Anthony Howell, Gareth Evans, Eugene V McCloskey, Sue Ashley, Rosemary Greenhalgh, Jenny Affen, Lesley Ann Flook and Alwynne Tidy. Red Clover isoflavones are safe and well tolerated in women with family history of breast cancer. *Menoapuse International* (2008); 14: 6-12.